

# 慢性皮膚炎モデルにおける HDC 遺伝子レポーターマウスを用いたヒスタミン産生細胞の同定

東北大学大学院工学研究科

大津 浩

Reducing the rate for contact dermatitis caused by cosmetic materials is crucial in cosmetology. Histamine is one of the physiological substances which produce itching sensation in contact dermatitis. We generated histamine-deficient mice by knocking out the gene for histamine producing enzyme, histidine decarboxylase (HDC), to be used for the analysis of histamine activity in vivo. The mechanisms of histamine activity in contact dermatitis were analyzed in mouse model which was produced by the repeated ointment of trinitro-chlorobenzene (TNCB) on their back skin. The inflammation of histidine decarboxylase knock out (HDC-KO) mice were milder compared to their wild type counterpart. The number of regulatory T cells (Tregs) in the dermis was found to be reduced by the existence of histamine. This control mechanism appeared to be transmitted by TGF- $\beta$ 1 for its positive effect on the number of Tregs. The action of histamine is known to be transmitted through 4 types of histamine receptors (H1 to H4). H1 and H4 receptors among these receptors were pharmacologically found to transmit the signal of inflammation in this contact dermatitis model<sup>1)</sup>. Including these information histamine is a key substance for producing noxious symptom in dermatological diseases e.g. chronic inflammation, would healing and contact dermatitis. The regulatory mechanisms of histamine synthesis, however, in their pathological contexts have not been completely clarified because of lack of experimental materials. We lately produced the reporter mice which produce fluorescent signal according to their expression of histidine decarboxylase gene. Since these gene-manipulated mice emit fluorescent signal when they are active in transcription of histamine-synthesizing gene, we could analyze the timing and source of cells for histamine production in disease model through observation of fluorescence using this reporter mice. Previously we generated plasmid-based reporter mice to this purpose, however, the mice were prove to be useless, since the emission of fluorescence was not limited to histamine producing cells. We produced lately a BAC (bacterial artificial chromosome)-based transgenic mice to dodge this problem. We will produce a model of contact dermatitis in the new transgenic mice and discuss the role of histamine producing cells in contact dermatitis.

## 1. 緒言

化粧品学において、皮膚の炎症は化粧品を開発していく上において重要な問題点である。皮膚の炎症を動物レベルで解析していくために、私たちは、trinitro-chlorobenzene (TNCB) などのハプテンを繰り返してマウス背部皮膚に塗布して慢性の接触皮膚炎を誘導し、表皮肥厚を起こすことを観察している。ヒスタミンは炎症において皮膚反応を起こす重要な生体内アミンである。ヒスタミンの合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase HDC) をノックアウトさせた HDC-KO マウスを作製して、この接触性皮膚炎モデルを誘導し、野生型マウスと比較することによって、モデルにおけるヒスタミンの役割について検討している。その結果、HDC-KO マウスに接触皮膚炎を起こすと炎症の度合いが野生型に比較して弱く、ヒスタミンが接触皮膚炎を悪化させていることが判明している。その後、4種類のヒスタミン受容体(H1-H4受容体)のうち、特に、H1受容体とともにH4受容体もこのモデルにおいて重要であり、H1受容体阻害薬やH4受容体阻害薬で皮

膚炎の程度が軽快することを示している<sup>1)</sup>。ヒスタミンはマウス皮膚において慢性炎症、皮膚創傷治癒、接触性皮膚炎など多岐に渡り影響を与えることが報告されており、化粧品学的にも重要であることがわかっている。

ところがヒスタミンの生体内での産生調節機構については不十分な点が多い。本研究ではヒスタミン産生源を明らかにすべく HDC 遺伝子の発現をモニターするレポーターマウスを作製した。このマウスを使うことによって、産生細胞および産生の調節機構を明らかにしようとしている。そのために HDC 遺伝子のレポーター遺伝子を工夫し、今回は BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を利用し、プロモーター領域に蛍光色素のレポーター遺伝子を繋いだ HDC 遺伝子全体を含むような DNA でトランスジェニックマウスを作製し、上述した皮膚疾患モデルを再現する。ヒスタミンは必須アミノ酸の一種であるヒスチジンから生体内では唯一の酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) を介して産生されるため、この遺伝子の発現をモニターすることによりヒスタミンの産生について考察することが可能である。

## 2. 実験

### マウス皮膚炎モデルでの実験

私たちはマウス皮膚にハプテンを繰り返して塗布することによって皮膚炎を起こし、HDC-KO マウスと野生型マウ

Identification of the histamine-producing cells in chronic allergic contact dermatitis model using HDC-gene reporter mice.

Hiroshi Ohtsu

School of Engineering, Tohoku University

スの反応と比較することにより、皮膚炎におけるヒスタミンの役割について検討している<sup>1-3)</sup>。

以前にはプラスミッドを用いたHDC遺伝子発現のレポーターマウスを用意したが、このマウスはヒスタミン産生細胞以外にも非特異的に蛍光発光をするため、その後BACを用いたトランスジェニックマウスを作製することに予定を変更した。

計画は、接触皮膚炎モデルをトランスジェニックマウスで作製し、蛍光色素の強度と部位を病変部位で観察することである。近年T細胞、中でも制御性T細胞の皮膚アレルギー反応における重要性が明らかになってきており<sup>4)</sup>、ヒスタミンはアレルギー反応の惹起相ばかりではなく、炎症の感作相にも重要であることが明らかにされつつある。したがって、このアレルギー反応モデルにおいて感作相から惹起相に至る反応全体の中で、ヒスタミンの産生細胞は複数回、複数の種類の細胞に陽性にでることが予想でき、どの細胞のどの時相にでているかが興味深いと考えられる。その反応において、細胞特異的な表面マーカーを染色し、FACSにて解析し、蛍光の発光細胞の種類とその数について同定する。

さらに、ヒスタミンの反応経路において、その受容体であるH1～H4のうち、どの受容体を経由して皮膚疾患の増悪がみられるのかについて、それぞれの受容体のアゴニストとアンタゴニストをもちいることにより明らかにする。これによって、どのような薬剤が皮膚のアレルギー反応のどの時相に効果があるのかについて推測する。そして、その後化粧品を塗布して同様の実験を行なうことにより、化粧品によってヒスタミン産生細胞が出現するかどうかについての検討も進める。

### 3. 結果

#### 3. a. BACを用いたHDC遺伝子トランスジェニックマウスについて

##### トランスジェニックマウスの作製

ヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子はマウスのChromosome 2に存在する全長約23kbの遺伝子である。この遺伝子は12エクソンからなる遺伝子で、エクソン1に既に翻訳開始点が存在するため、その翻訳開始点直前よりGFP遺伝子が入るように工夫した

プラスミッドを用意する。そのためには、HDC geneの入ったBAC (bacterial artificial chromosome) クローンを購入し、HDC 遺伝子の転写開始点より637番目の塩基より、1777番目の塩基までPCRを用いて増幅する。増幅されたDNAをpGEM-T Easyに挿入し、クローン化する。このTA vectorを、multiple cloning siteにある2種類の制限酵素配列部位Sal IとApaIで消化すると、HDC 遺伝子のPCR増幅部位を含む断片が切り出される。切り出された断片を予めクローン化していたHDC 遺伝子のプロモーター約1kbを含むpBlue ScriptのHDCプロモーターの下流にあるSalIおよびApaI siteに挿入し、クローン化する(plasmid 1と命名)。GFP (green fluorescence protein)をmultiple cloning siteに含んだ7.1 IS GFP 3<sup>rd</sup> Versionより、XhoIとXbaIにてdouble digestionし切り出したGFP遺伝子を、pBlue Scriptの同様の制限酵素部位に挿入し、クローン化する。このプラスミッドのXbaI siteで再度酵素処理し、直鎖上にしたプラスミッドをKlenowによって平端化しておく。pBS-FRT-Neo-FRTよりKpnIとEcoRVで切り出しKpnI siteをT4 DNA polymeraseしてこちらも平端化したNeo遺伝子断片を、予め平坦化しておいたGFPを含むプラスミッドにblunt end ligationし、GFPの下流にNew 遺伝子が挿入されたプラスミッドを用意する。このプラスミッドをXhoIとNotIで消化し、Klenow処理をして、NotI siteを平端化しておく。このDNA断片はGFPの下流にNeo遺伝子が繋がった断片である。plasmid1をSalIおよびHincII siteで消化したHDC promoterとHDC 1<sup>st</sup> Intronが入った断片と、GFP + Neo断片をligationすると、XhoI siteとSal I siteがコンカテマーであるために繋がり、HDC promoterとHDC 1<sup>st</sup> Intronの間にGFPとNeoを含むpBlue Scriptができて上がる。このプラスミッドをNotI siteで切り出すと、HDC promoterとHDC 1<sup>st</sup> Intronの間にGFPおよびNeoを含む断片ができて、その断片とHDCを含むBAC DNAとの間でhomologous recombinationを起こさせる。その結果、HDC promoterと1<sup>st</sup> Intronの間にGFPおよびNeo遺伝子が入ったBACが完成する。このBAC cloneの入った大腸菌をArabinose存在下で培養するとNeo遺伝子の両端に存在下CREが互いに反応してNeo遺伝子のないBACが完成する。完成したBAC cloneの簡単な構造を示す(Fig. 1)。

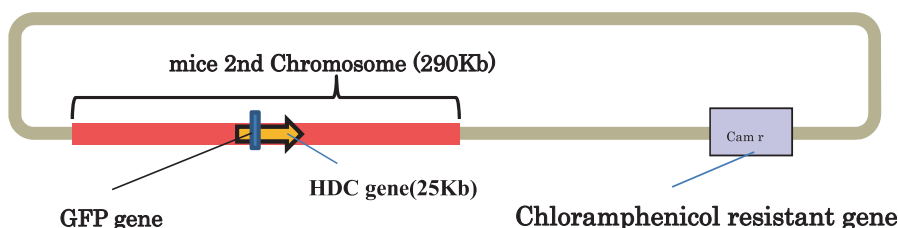


Fig. 1 完成した HDC-GFP BAC clone

この、BACクローンをmouse 受精卵に打ち込みその個体を発生させることにより、レポーターマウスが完成する。発生してきた個体の尾からゲノムDNAを抽出し、PCR法にて個体にGFP geneやChloramphenicol resistant geneの存在の有無を確かめたところ、高率にBACクローンが存在するマウスが発生してきた(Fig. 2)。

### 3. b. トランスジェニックマウスの確認

#### 3. b. 1. 遺伝子の確認

受精卵への打ち込みにより発生した7個体内、No 569とNo572の2個体のマウスにBAC DNAが挿入されていることが確認された。

#### 3. b. 2. 蛍光の確認

次に、このレポーターマウスの各臓器の切片を用意して、HDC産生細胞が蛍光を発するかどうかを蛍光顕微鏡にて

確認する。その結果、HDC遺伝子が発現する細胞群(脳: TMN (結節乳頭核)細胞、胃: ECL細胞など)で、GFPが染色されていた (Fig. 3: TMN cells 結節乳頭核、ECL エンテロクロマフィン様)。

さらにここで、脳視床下部や胃体部におけるGFP発現は免疫染色で確認しているがHDC産生細胞と一致しているかどうかについて確認が必要であった。レポーターマウスから摘出した胃におけるGFPとHDCの免疫染色を遂行した。近接する切片を使ってGFPの一次抗体(Cell Signaling Technology)とHDCの一次抗体(Acris Antibody)を反応させ、その後、ペルオキシダーゼを標識した二次抗体と反応させ、DAB染色キットを用いて二次抗体が結合した部位を褐色に発色させた。染色パターンはGFPとHDCで一致していることが判明した。また小腸壁での細胞においては、肥満細胞の他に、好酸球や好塩基球

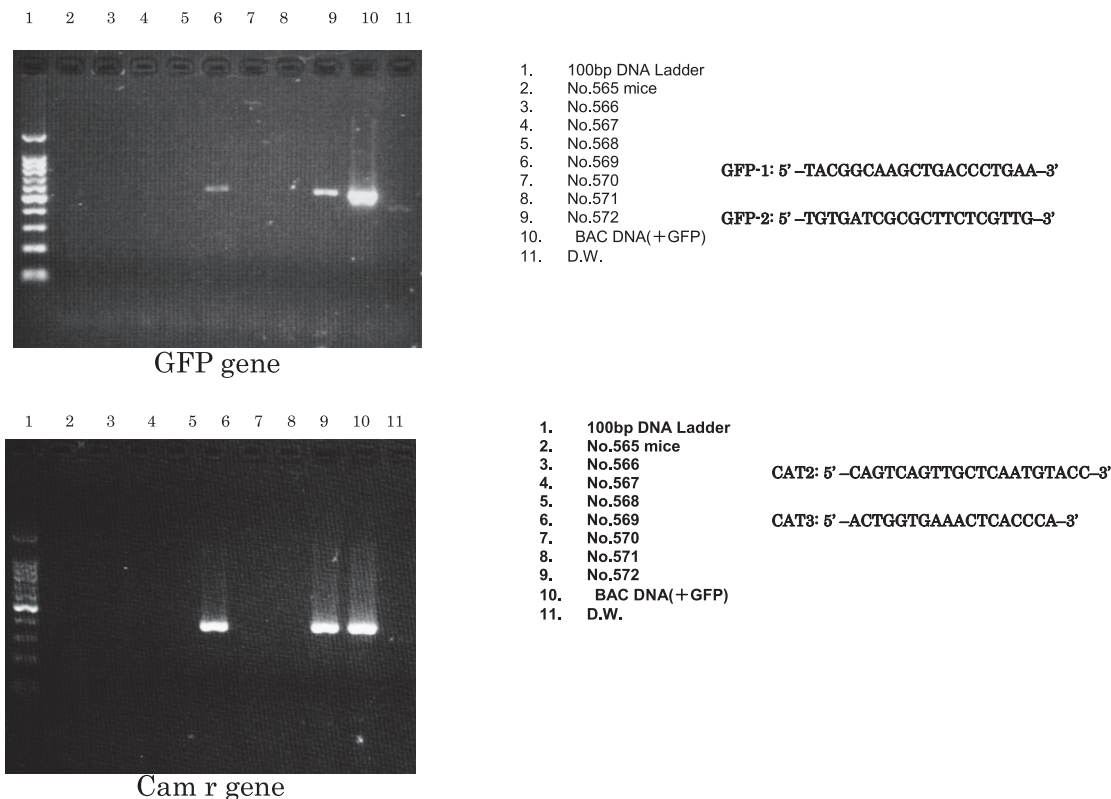


Fig. 2. 初代マウスの遺伝子解析  
 挿入遺伝子内 GFP gene, Cam r gene の PCR による確認

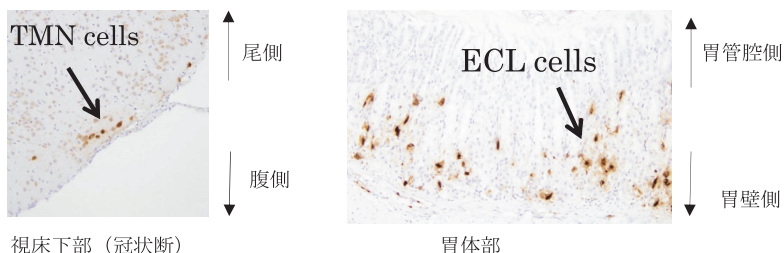


Fig. 3 GFP の免疫染色

にも蛍光の発光がみられ、現在まで考えられていた以上に多種類の血液細胞にヒスタミンが存在する可能性が出てきている。このため、今後様々な病態モデルを使った実験においても新たなヒスタミン産生細胞を認める可能性が高いと考えている。

### 3. c. 皮膚アレルギー実験

私たちは、TNCBを繰り返し塗布する実験系において、通常鱗屑をとともう紅斑が起り、皮膚の生検をすると表皮の増殖と細胞間の浮腫および真皮の線維化および細胞浸潤が起きていることを確認しているが、ヒスタミンを欠く HDC (-/-) マウスではその程度が減弱することを確認している (Fig. 4, 参考論文より改変)。トルイジンブルーで染色すると、肥満細胞数が減少しており、また、IL-4の皮膚内での濃度も優位に抑制されていた。

また、組織中の制御性T細胞の数も CTLA-4や Foxp3 に対する免疫染色で染色することによって計測すると、HDC (-/-) マウスに優位に増加していることが明らかとなった。次に TGF- $\beta$ 1 のレベルを、制御性T細胞の遊走におよぼすサイトカインの代表として測定した。その結果、HDC (-/-) マウスでは TGF- $\beta$ 1 の組織内での濃度はノックアウトマウスでは増えており、TGF- $\beta$ 1 が制御性T細胞の遊走を促している可能性が出てきた。TGF- $\beta$ 1 の直接的な影響について調べるために、毎日の TNCB の塗布の直前に、TGF- $\beta$ 1 やその抗体を直接マウスの背部真皮に注射して制御性T細胞の数を測定してみた。その結果は、TGF- $\beta$ 1 を注射することにより制御性T細胞の指標となる Foxp3 陽性細胞や CTLA-4 陽性細胞が増え、逆に、高 TGF- $\beta$ 1 抗体を注射することによりこれらの陽性細胞数が減弱した。また BALB/c を用いた実験では、H1 受容体拮抗剤であるオロパタジン、H4 受容体拮抗剤である JNJ777120 の作用で、ともに TGF- $\beta$ 1 や Foxp3 陽性細胞が上昇していることが分かった (Fig. 4)。

これらの基礎的な実験を踏まえて来年度はトランスジェニックマウスを用いた皮膚アレルギー実験を試行する予定

である。

## 4. 考察

ヒスタミンはアナフィラキシー様の反応を示す物質として約1世紀前に発見され、研究史が長いものの、最近まで知られているヒスタミン受容体は H1 と H2 の2種類のみであった。神経節前線維に H3 受容体が存在することは提唱されていたが、cDNA のクローニングが発表されたのは1999年である。更に H4 受容体が末梢白血球から見つかり cDNA のクローニングの報告は2000年である。このようにヒスタミンは長い研究史があるものの、近年、分子生物学の手法がとられるようになってから新しい機能が次々と発見されている。皮膚の炎症において、ヒスタミンはその進展に重要な影響を与え、発赤、腫脹、痒みなどを促す起炎物質である。私たちはヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子をクローニングし、ノックアウトマウスを作製することによって、ヒスタミンを合成不能なマウスを得て実験を行ない、血管新生、肉芽種の形成にはヒスタミンの存在が重要であることと、その反応は H2 受容体を介することを明らかにした<sup>5)</sup>。従来までは皮膚炎は H1 受容体を介すると考えられていたが H4 受容体も重要であることが報告された<sup>1,6)</sup>。このように皮膚炎には3種類のヒスタミン受容体すなわち H1、H2 および H4 受容体が重要であることがわかる。従って、皮膚炎におけるヒスタミンの作用は単純ではなく、今後、新しいトランスジェニックマウスを使った実験をすることにより、ヒスタミンの接触性皮膚炎における役割は、より詳細な解析が行なえる。

皮膚アレルギーの実験系において、ハプテンを繰り返し塗布することによって、皮膚疾患を慢性化させて、CACD (chronic allergic contact dermatitis) のモデルとなる<sup>7)</sup>。制御性T細胞は免疫の恒常性維持や自己免疫反応の予防に必要であるとともに、エフェクターT細胞を抑えて接触皮膚炎を改善させることが証明されている<sup>8)</sup>。ところが、制御性T細胞はCACDにおける働きがよくわかってはいない。

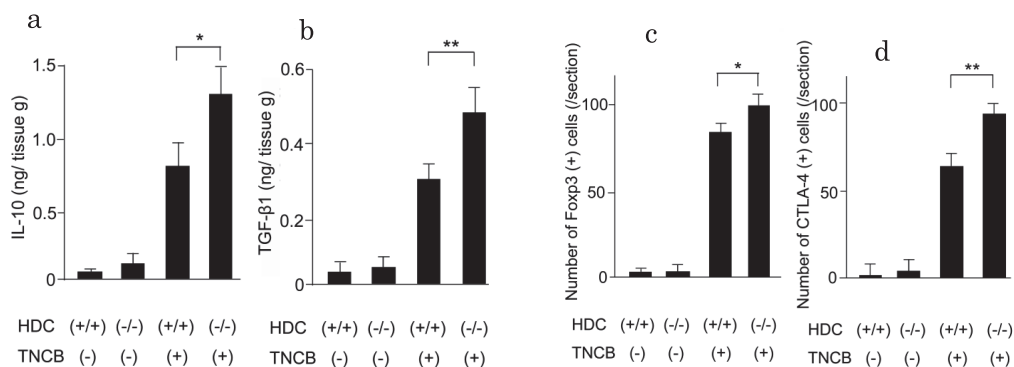


Fig. 4 HDC-KO マウスの慢性接触皮膚炎におけるサイトカインや制御性T細胞数の増強作用 (引用文献 11 より改変)

今回の実験によって、ヒスタミンは制御性T細胞の皮膚組織への遊走をおそらくTGF- $\beta$ 1を介してコントロールすることが分かった。制御性T細胞におけるFoxp3は炎症の制御に重要であることはこの遺伝子の機能を無くさせる変異をいれたマウスでは多臓器における炎症反応が起きることが示されているからである<sup>9)</sup>。制御性T細胞を動物に外部から加えると接触性皮膚炎におけるマスト細胞の遊走や活性を抑え、炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られている<sup>10)</sup>。このことは、CACDでもどのように考えられ、わたしたちの今回の報告でもマスト細胞の遊走やIL-4のレベルが抑えられていた<sup>11)</sup>。制御性T細胞の抑制効果はCTLA-4を経由している可能性があることがCTLA-4への抗体を使った実験で示されている<sup>12)</sup>。気管支喘息のモデルにおいて、制御性T細胞はIL-10の産生を介してTh2細胞主体のアレルギー反応を抑えることが報告されているが<sup>13)</sup>、私たちもHDC (-/-) マウスではIL-10が組織で上昇してきたことを考えると、もし同様の機構が起きているとするとCACDの皮膚肥厚反応の抑制がIL-10を介して起きている可能性があると考えている。また、TGF- $\beta$ 1が制御性T細胞を誘導してくる際にIL-2が必要であることが示されており<sup>14)</sup>、TGF- $\beta$ 1を加えたマウスがIL-2が上昇してきた結果を鑑みるに、これらのサイトカインが相乗的に制御性T細胞を増やし、それによってCACDにおいてはエフェクターT細胞をコントロールする機構も考えられる。

本研究の中心課題は遺伝子改変マウスを用いたヒスタミンの接触皮膚炎に与える影響の研究である。これは化粧品を皮膚に塗布した際に起こりがちな接触皮膚炎をコントロールするために重要な情報を提供する。私たちが作製した新しいトランスジェニックマウスはヒスタミン合成が転写レベルで活性化したときに蛍光を発するためこのマウスで接触皮膚炎を起こし、蛍光顕微鏡を用いて観察すれば1)ヒスタミン合成細胞、2)ヒスタミン合成の時期がわかる。最近の研究によると従来知られているマスト細胞、マクロファージ、神経細胞に加え、好中球、好塩基球もヒスタミンを産生し、皮膚ケラチノサイト、樹状細胞からの産生報告もある。化粧品によっては、ヒスタミン合成促進あるいは合成抑制に働く可能性があり、基本的に合成抑制の基材を使うように開発を進めるための動物モデルの指標になる。以上のように、本研究課題の成果は医学的基礎知識を拡充させるとともに、コスメトロジーにおける基材の選択に役立たせる上でも重要な情報を提供すると考えている。

## 5. 総括

本報告ではトランスジェニックマウスの作製とその評価および現在までの皮膚アレルギー実験の結果をまとめた。今後、実際用意したトランスジェニックマウスを用いて、

皮膚アレルギーモデルを作製し、ヒスタミンの産生源となる細胞の同定を行なっていく予定である。

## (引用文献)

- 1) Seike M, Furuya K, Ohmura M, Watanabe K and Ohtsu H. Histamine H4 receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. *Allergy* 65, 319-326, 2010.
- 2) Seike M, Ikeda M, Kodama H, Terui T and Ohtsu H. Inhibition of scratching behavior caused by contact dermatitis in histidine-decarboxylase gene knockout mice. *Exp Dermatol* 14, 169-75, 2005.
- 3) Hamada R, Seike M, Kamijima R, Ikeda M, Kodama H and Ohtsu H. Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine. *Eur J Pharmacol* 547, 45-51, 2006.
- 4) Gomez de Agüero M, Vocanson M, Hacini-Rachinel F, Taillardet M, Sparwasser T, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaiserlian D, Dubois B. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J Clin Invest* 122, 1700-11, 2012.
- 5) Ghosh AK, Hirasawa N, Ohtsu H, Watanabe T and Ohuchi K: Defective angiogenesis in the inflammation granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not mast cell-deficient mice. *J Exp Med* 195, 973-982, 2002
- 6) Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, McQueen D and Thurmond RL. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol* 119, 176-83, 2007.
- 7) Wang G, Savinko T, Wolff H, Dieu-Nosjean MC, Kemeny L, Homey B, Lauerma AI and Alenius H. Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clin Exp Allergy*. 37, 151-61, 2007
- 8) **Tomura M**, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O and Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest*. 120, 883-93, 2010
- 9) Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams CB, Wang J, Martín MG and Chatila TA. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia

- E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 1106-15, 2005.
- 10) Su W, Fan H, Chen M, Wang J, Brand D, He X, Quesniaux V, Ryffel B, Zhu L, Liang D and Zheng SG. Induced CD4+ forkhead box protein-positive T cells inhibit mast cell function and established contact hypersensitivity through TGF- $\beta$  1. *J Allergy Clin Immunol.* 130, 444-52, 2012
- 11) Tamaka K, Seike M, Hagiwara T, Sato A and Ohtsu H. Histamine suppresses regulatory T cells mediated by TGF- $\beta$  in murine chronic allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol.* 24, 280-4, 2015.
- 12) Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol.* 34, 366-76, 2004.
- 13) Kearley J, Barker JE, Robinson DS and Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med.* 202, 1539-47, 2005.
- 14) Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J and Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 178, 4022-6, 2007.

(財団事務局追記)

著者は本助成研究の期中に所属異動となり、採択課題の継続が困難になったため、中間時の報告を研究完了報告として掲載します。